



Issue Number : 5-5-2009-058869759

USSN 10/599,290
Conf. No. 6567
Filed: March 25, 2008
Priority Document
Sughrue ref: Q97193



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

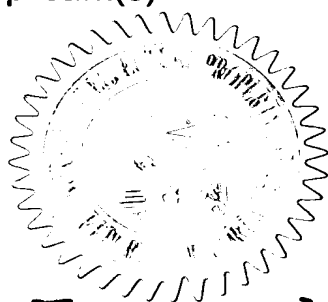
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0020800
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 03월 26일
Filing Date MAR 26, 2004

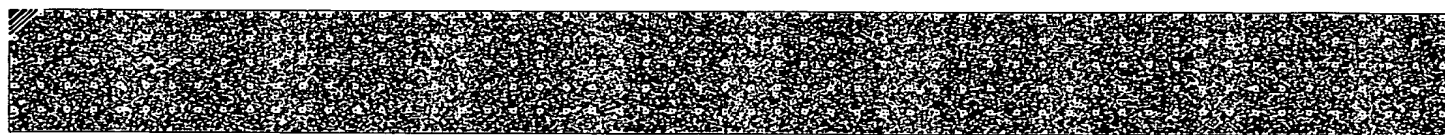
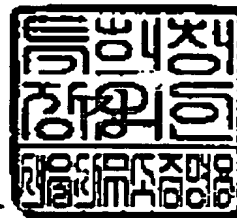
출원 인 : (주)아모레퍼시픽
Applicant(s) AMOREPACIFIC CORPORATION

2009년 10월 23일



특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

제출 일자 : 2008-07-22

1020040020800

【서지사항】

【서류명】 보정서
【보정구분】 명세서등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 (주)아모레퍼시픽
【출원인코드】 1-2006-024137-8
【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 윤동열
【대리인코드】 9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】 2006-044452-8

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0020800

【제출원인이 된 서류의 발송번호】 9-5-2008-0275148-45

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음
【보정방법】 별지와 같음
【보정내용】 별지와 같음

위와 같이 특허청장(특허심판원장, 심판장)에게 제출합니다.

대리인

윤동열 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000원
【추가심사청구료】 0원

제출 일자 : 2008-07-22

1020040020800

【기타 수수료】 0원

【합계】 3,000 원

【보정서】**【보정대상항목】** 청구항 1**【보정방법】** 정정**【보정내용】****【청구항 1】**

자외선 조사로 유도되는 세포사멸 억제제에 있어서, 20-O-b-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올(진세노사이드 F1)과 (-)에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부세포 손상 방지용 세포사멸 억제제.

【보정대상항목】 청구항 2**【보정방법】** 정정**【보정내용】****【청구항 2】**

자외선 조사로 감소되는 Bcl-2 발현 조절제에 있어서, 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부세포 손상 방지용 Bcl-2 발현 조절제.

【보정대상항목】 청구항 3**【보정방법】** 정정

【보정내용】**【청구항 3】**

자외선 조사로 감소되는 Brn-3a 발현 조절제에 있어서, 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부세포 손상 방지용 Brn-3a 발현 조절제.

【보정대상항목】 청구항 4**【보정방법】 정정****【보정내용】****【청구항 4】**

진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부세포 손상 방지용 Rb 단백질의 탈인산화 억제제.

【보정대상항목】 청구항 5**【보정방법】 정정****【보정내용】****【청구항 5】**

진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하여 자외선 노출에 의한 세포손상을 방지하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 억제용 화장료 조성물.

【보정대상항목】 청구항 6

제출 일자 : 2008-07-22

1020040020800

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 6】

진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부세포 손상 방지용 화장료 조성물.

출원번호: 10-2004-0020800

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2007.06.05
【제출인】	
【명칭】	(주)아모레퍼시픽
【출원인코드】	1-2006-024137-8
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2006-044452-8
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0020800
【출원일자】	2004.03.26
【심사청구일자】	2007.06.05
【발명의 명칭】	진세노사이드 F 1과 E G C G을 함유한 자외선 조사로 유도되는 피부손상 방지용 조성물
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2004-0125506-74
【접수일자】	2004.03.26
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

출원번호: 10-2004-0020800

【취지】 「특허법 시행규칙」 제13조 · 「실용신안법 시행규칙」 제17조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

대리인

윤동열 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000원

【추가심사청구료】 0원

【기타 수수료】 0원

【합계】 3,000 원

【첨부서류】 1.보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 42

【보정방법】 정정

【보정내용】

<42>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 49

【보정방법】 정정

출원번호: 10-2004-0020800

【보정내용】

<49>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 50

【보정방법】 정정

【보정내용】

<50>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아(thiourea), 2mM PMSF 및 $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴(leupeptine)이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500 \mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여

출원번호: 10-2004-0020800

상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 20 μ g을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50 V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-PARP(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. PARP 단백질의 절단된 양은 대조구의 절단된 양을 기준으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 56

【보정방법】 정정

【보정내용】

<56>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄

출원번호: 10-2004-0020800

올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 $60\text{mJ}/\text{cm}^2$ 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 57

【보정방법】 정정

【보정내용】

<57>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000\times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Bcl-2(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블

출원번호: 10-2004-0020800

롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 63

【보정방법】 정정

【보정내용】

<63>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 64

【보정방법】 정정

출원번호: 10-2004-0020800

【보정내용】

<64>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000\times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Brn-3a(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 70

【보정방법】 정정

출원번호: 10-2004-0020800

【보정내용】

<70>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 $60 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 71

【보정방법】 정정

【보정내용】

<71>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500 \mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad

출원번호: 10-2004-0020800

Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 20 μ g을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50 V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Rb(Santa Cruz; 모든 형태의 Rb(과인산화, 저인산화 형태 등) 감지)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 같은 블롯을 6.25 mM Tris, 2% SDS, 100mMβ-머캅토에탄올의 용액으로 50℃에서 10분씩 2번 세척하였다. 다시 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 monoclonal anti-underphosphorylated Rb(BD Biosciences; 저인산화 형태의 Rb만 감지)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

출원번호: 10-2004-0020800

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2006.09.22
【제출인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【사건과의 관계】	출원인
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0007885
【출원일자】	2003.02.07
【심사청구일자】	2003.02.07
【발명의 명칭】	Musk를 함유하는 피부건조 개선용 피부외용제 조성물
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2006-0116014-74
【발송일자】	2006.08.31
【보정할 서류】	출원인 변경 신고서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	첨부서류
【보정방법】	제출
【보정내용】	
【첨부서류】	1.기타첨부서류_1통

출원번호: 10-2004-0020800

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위
와 같이 제출합니다.

제출인

주식회사 태평양 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

출원번호: 10-2004-0020800

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2006.08.21
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주)아모레퍼시픽
【출원인코드】	1-2006-024137-8
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0007885
【출원일자】	2003.02.07
【심사청구일자】	2003.02.07
【발명의 명칭】	Musk를 함유하는 피부건조 개선용 피부외용제 조성물
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0012671
【출원일자】	2003.02.28
【심사청구일자】	2003.02.28
【발명의 명칭】	모발용 컨디셔너 조성물
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0012672
【출원일자】	2003.02.28
【심사청구일자】	2003.02.28
【발명의 명칭】	고분자 나노구조체를 함유한 샴푸조성물

출원번호: 10-2004-0020800

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0019195

【출원일자】 2003.03.27

【심사청구일자】 2003.03.27

【발명의 명칭】 대두배아 이소플라본 어글리콘, 석류추출물 및 세코이소라 리시레시놀로 이루어진 IB complex을 함유하는 피부주름 개선 및 탄력증진용 외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0019384

【출원일자】 2003.03.28

【심사청구일자】 2003.03.28

【발명의 명칭】 폴리올/고분자 마이크로캡슐을 이용한 유효성분 안정화 방법 및 이를 함유하는 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0026016

【출원일자】 2003.04.24

【심사청구일자】 2003.04.24

【발명의 명칭】 3,4,5-트리메톡시 신남산 티올 에스테르를 함유하는 고분자 캡슐 및 이의 제조방법, 및 이를 함유하는 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0032550

【출원일자】 2003.05.22

【심사청구일자】 2003.05.22

【발명의 명칭】 아크릴 중합체를 함유하는 립스틱 조성물

【사건의 표시】

출원번호: 10-2004-0020800

【출원번호】 10-2003-0041552
【출원일자】 2003.06.25
【심사청구일자】 2003.06.25
【발명의 명칭】 데아닌의 경피흡수 촉진 방법 및 이를 함유하는 피부외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0042703
【출원일자】 2003.06.27
【심사청구일자】 2003.06.27
【발명의 명칭】 자기회합성을 갖는 양친성 고분자를 사용하여 난용성 물질을 포집시켜 제조한 나노입자 및 이를 함유하는 피부 외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0058711
【출원일자】 2003.08.25
【심사청구일자】 2003.08.25
【발명의 명칭】 자외선 흡수제를 함유하는 고분자 캡슐 및 그 제조 방법, 및 이를 함유하는 화장품 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0065386
【출원일자】 2003.09.20
【심사청구일자】 2003.09.20
【발명의 명칭】 피부 주름 개선용 또는 피부 탄력 증진용 피부 외용제 조성물

【사건의 표시】

출원번호: 10-2004-0020800

【출원번호】 10-2003-0081033
【출원일자】 2003.11.17
【심사청구일자】 2003.11.17
【발명의 명칭】 사인 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물 및 건강보조식품

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0082144
【출원일자】 2003.11.19
【심사청구일자】 2003.11.19
【발명의 명칭】 피부 미백 화장품 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0086404
【출원일자】 2003.12.01
【심사청구일자】 2003.12.01
【발명의 명칭】 생약재 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0086405
【출원일자】 2003.12.01
【심사청구일자】 2003.12.01
【발명의 명칭】 생약재 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0087283
【출원일자】 2003.12.03
【심사청구일자】 2003.12.03
【발명의 명칭】 코엔자임 Q10을 함유한 자기회합성 고분자 나노입자 및 이를 함유한 피부 외용제 조성물

출원번호: 10-2004-0020800

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0091924

【출원일자】 2003. 12. 16

【심사청구일자】 2003. 12. 16

【발명의 명칭】 폴리카프로락톤에 기반한 양친성 고분자를 이용한 에멀전 타입의 피부외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0091925

【출원일자】 2003. 12. 16

【심사청구일자】 2003. 12. 16

【발명의 명칭】 액정베이스를 함유하는 마스크라 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0093695

【출원일자】 2003. 12. 19

【심사청구일자】 2003. 12. 19

【발명의 명칭】 에멀전의 상 변이 측정을 위한 전자 칩의 구조 및 측정 방법

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0095414

【출원일자】 2003. 12. 23

【심사청구일자】 2003. 12. 23

【발명의 명칭】 식이섬유를 함유하는 슬리밍 식품 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0098859

【출원일자】 2003. 12. 29

【심사청구일자】 2003. 12. 29

출원번호: 10-2004-0020800

【발명의 명칭】 슬리밍용 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0002910

【출원일자】 2004.01.15

【심사청구일자】 2004.01.15

【발명의 명칭】 피부 미백 효능을 상승시키는 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0004714

【출원일자】 2004.01.26

【심사청구일자】 2004.01.26

【발명의 명칭】 진세노사이드 F 1 또는 화합물 K를 함유하는 피부외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0007805

【출원일자】 2004.02.06

【심사청구일자】 2004.02.06

【발명의 명칭】 불용성 입자를 안정하게 부유시킬 수 있는 전신 인체 세정제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0008305

【출원일자】 2004.02.09

【심사청구일자】 2004.02.09

【발명의 명칭】 수박내피 추출물을 함유하는 민감성 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0008909

【출원일자】 2004.02.11

출원번호: 10-2004-0020800

【심사청구일자】 2004.02.11

【발명의 명칭】 은/고분자 나노복합 구형체 및 그 제조방법, 및 이를 함유하는 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0016578

【출원일자】 2004.03.11

【심사청구일자】 2004.03.11

【발명의 명칭】 고려인삼의 향취를 재현한 향료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0018504

【출원일자】 2004.03.18

【심사청구일자】 2004.03.18

【발명의 명칭】 난용성 약물 함유 서방성 미세입자 및 그 제조방법

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0019668

【출원일자】 2004.03.23

【심사청구일자】 2004.03.23

【발명의 명칭】 한방 생약재 추출물을 함유하는 피부에 보습 효과를 주는 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0019994

【출원일자】 2004.03.24

【심사청구일자】 2004.03.24

【발명의 명칭】 피부 도포시 흘러내리지 않는 투명 바디 오일

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0020401

출원번호: 10-2004-0020800

【출원일자】 2004.03.25
【심사청구일자】 2004.03.25
【발명의 명칭】 항노화 효과를 나타내는 히드록삼산 유도체 및 이의 제조방법

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0020800
【출원일자】 2004.03.26
【심사청구일자】 2004.03.26
【발명의 명칭】 진세노사이드 F1과 EGCG을 함유한 자외선 조사로 유도되는 피부손상 방지용 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0022005
【출원일자】 2004.03.31
【심사청구일자】 2004.03.31
【발명의 명칭】 녹차의 향취를 재현한 향료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0022668
【출원일자】 2004.04.01
【심사청구일자】 2004.04.01
【발명의 명칭】 폴리글리세릴-3 메틸글루코스디스테아레이트를 사용하여 제조된 수중유형의 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0022875
【출원일자】 2004.04.02
【심사청구일자】 2004.04.02

출원번호: 10-2004-0020800

【발명의 명칭】 생리/심리적 치료 효과를 갖는 향료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0023439

【출원일자】 2004.04.06

【심사청구일자】 2004.04.06

【발명의 명칭】 혼합이성화당과 은행잎 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0024437

【출원일자】 2004.04.09

【심사청구일자】 2004.04.09

【발명의 명칭】 고압유화기술에 의한 대황추출물의 경피흡수 촉진방법 및 이를 응용한 미백용 피부외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0024704

【출원일자】 2004.04.10

【심사청구일자】 2004.04.10

【발명의 명칭】 펜타에리스리톨 유도체와 이의 제조방법, 및 이를 포함하는 액정베이스

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0025710

【출원일자】 2004.04.14

【심사청구일자】 2004.04.14

【발명의 명칭】 진세노사이드를 함유하는 고분자 캡슐 및 그 제조 방법, 및 이를 함유하는 화장료 조성물

출원번호: 10-2004-0020800

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0025711
【출원일자】 2004.04.14
【심사청구일자】 2004.04.14
【발명의 명칭】 피부주름 개선 및 탄력증진용 피부외용제 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0025712
【출원일자】 2004.04.14
【심사청구일자】 2004.04.14
【발명의 명칭】 금은화, 상백피, 황금 추출물을 함유하여 염증완화능을 갖는 항 자외선용 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0027207
【출원일자】 2004.04.20
【심사청구일자】 2004.04.20
【발명의 명칭】 빠른 전상과 반투명한 외관을 갖는 마사지용 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0031050
【출원일자】 2004.05.03
【심사청구일자】 2004.05.03
【발명의 명칭】 모발 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0031727
【출원일자】 2004.05.07
【심사청구일자】 2004.05.07
【발명의 명칭】 피부 외용제 조성물

출원번호: 10-2004-0020800

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0034837
【출원일자】 2004.05.17
【심사청구일자】 2004.05.17
【발명의 명칭】 피부탄력 증진용 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0035060
【출원일자】 2004.05.18
【심사청구일자】 2004.05.18
【발명의 명칭】 피부보습용 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0035061
【출원일자】 2004.05.18
【심사청구일자】 2004.05.18
【발명의 명칭】 피부보습용 화장료 조성물

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2004-0037370
【출원일자】 2004.05.25
【심사청구일자】 2004.05.25
【발명의 명칭】 한방 생약재의 초임계 추출물을 함유하는 혈행촉진용 피부
외용제 조성물

【변경원인】 법인분할

출원번호: 10-2004-0020800

【취지】 특허법 제38조제4항 · 실용신안법 제20조 · 디자인보호법 제24조 및 상표법 제12조제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다.

구명의인 주식회사 태평양 (인)

신명의인 (주)아모레퍼시픽 (인)

【수수료】 312,000 원

【첨부서류】 1.기타첨부서류_1통 2.기타첨부서류_1통

출원번호: 10-2004-0020800

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.26
【발명의 국문명칭】	진세노사이드 F1과 EGCG을 함유한 자외선 조사로 유도되는 피부손상 방지용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition for preventing UVB-induced skin damage by treating both Gensenoside F1 and EGCG
【출원인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2003-051571-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조시영
【성명의 영문표기】	CH0,Si Young
【주민등록번호】	710220-2XXXXXX
【우편번호】	449-950
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 공세리 청구아파트 102동 1302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강병영
【성명의 영문표기】	KANG,Byung-Young

출원번호: 10-2004-0020800

【주민등록번호】 690705-1XXXXXX

【우편번호】 137-769

【주소】 서울특별시 서초구 반포4동 미도아파트 307동 1506호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 염명훈

【성명의 영문표기】 YEOM, Myeong Hoon

【주민등록번호】 671025-1XXXXXX

【우편번호】 449-548

【주소】 경기도 용인시 수지읍 죽전2동 832번지 벽산아파트 101동
902호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이태룡

【성명의 영문표기】 LEE, Tae Ryong

【주민등록번호】 650214-1XXXXXX

【우편번호】 442-470

【주소】 경기도 수원시 팔달구 영통동 태영아파트 932동 1303호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장이섭

【성명의 영문표기】 CHANG, Ih-Seop

【주민등록번호】 580910-1XXXXXX

【우편번호】 449-846

【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천1동 703번지 동보아파트 102동
1104호

출원번호: 10-2004-0020800

【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

윤동열 (인)

【수수료】

【기본출원료】 31 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 38,000 원

【첨부서류】 1. 위임장[2003년 7월 24일자 포괄위임등록]_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 진세노사이드 F1(20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올)과 EGCG((-)에피갈로카테킨-3-갈레이트)의 상승효과에 의한 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상기 화합물들을 동시에 처리하는 것을 특징으로 하는, 자외선 조사로 유도되는 피부세포의 사멸을 방지하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 단독 처리시에는 효과가 없는 낮은 농도의 두 화합물을 혼합하여 처리함으로써 자외선 조사에 의해 유발되는 Bcl-2의 발현 감소를 효과적으로 억제하여 피부세포의 사멸을 방지하는 Bcl-2 발현 조절제로서의 용도를 제공한다. 또한, 암억제 유전자인 Rb 단백질의 탈인산화를 억제하여 안정화시킴으로써 자외선에 의한 피부세포의 손상을 방지하는 용도를 제공한다. 본 발명을 통해 단가가 높은 두 화합물을 낮은 농도(단독 사용시 각각 2.5배, 5배 농도 필요)로 사용함으로써 원료비를 낮추어 고기능성 제품을 보다 저렴한 가격에 공급할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올*진세노사이드 F1*녹차 추출물*(-)에피갈로카테킨-3-갈레이트* EGCG*Bcl-2 조절제*피부노화 억제물질*Rb의 탈인산화 억제제

【명세서】

【발명의 명칭】

진세노사이드 F1과 EGCG을 함유한 자외선 조사로 유도되는 피부손상 방지용 조성물 {Composition for preventing UVB-induced skin damage by treating both Gensenoside F1 and EGCG}

【도면의 간단한 설명】

<1> 도 1은 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 피부세포의 사멸 억제 효과를 보여주기 위한 MTT 환원반응 실험 결과 그래프이다.

<2> 도 2는 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 PARP 단백질(poly ADP-ribose-polymerase)의 절단 억제 효과를 보여주기 위해 웨스턴 블로팅을 수행한 결과이다. A는 자외선을 조사하지 않았을 때이고, B는 60mJ/cm²의 자외선을 조사한 결과이다. Hsp70은 동일한 단백질양이 사용되었음을 나타낸다. 도 2에서 각각의 시료는, 1번은 대조구; 2번은 2mM의 진세노사이드 F1로 처리; 3번은 10mM의 EGCG로 처리; 4번은 “2mM의 진세노사이드 F1 + 10mM의 EGCG”로 처리; 5번은 5mM의 진세노사이드 F1로 처리; 및 6번은 50mM의 EGCG로 처리;한 것을 나타낸다.

<3> 도 3은 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Bcl-2의 발현 감소 억제 효과를 보여주기 위해 웨스턴 블로팅을 수행한 결과이다. A는 자외선을 조사하지 않았을 때이고, B는 60mJ/cm²의 자외선을 조사한 결과이다. Hsp70은 동일한 단백질양이 사용되었음을 나타낸다. 시료별 처리량은 도 2와 동일하다.

출원번호: 10-2004-0020800

<4>

도 4는 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Brn-3a의 발현 감소 억제 효과를 보여주기 위해 웨스턴 블로팅을 수행한 결과이다. A는 자외선을 조사하지 않았을 때이고, B는 60mJ /cm²의 자외선을 조사한 결과이다. Hsp70은 동일한 단백질 양이 사용되었음을 나타낸다. 시료별 처리량은 도 2와 동일하다.

<5>

도 5는 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Rb 단백질의 탈인산화 억제 효과를 보여주기 위해 웨스턴 블로팅을 수행한 결과이다. 위의 블롯은 모든 인산화 형태의 Rb 단백질을 감지하는 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅을 수행한 결과이고, 아래 블롯은 같은 멤브레인을 저인산화 형태의 Rb만을 감지하는 항체를 이용하여 수행한 결과이다. 또, A는 자외선을 조사하지 않았을 때이고, B는 60mJ /cm²의 자외선을 조사한 결과이다. 시료별 처리량은 도 2와 동일하다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

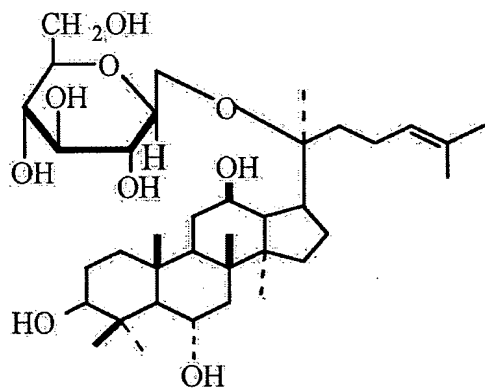
<6>

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 F1(20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올)과 하기 화학식 2로 표시되는 EGCG((-)-에피갈로카테킨-3-갈레이트)의 상승효과에 의한 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상기 화합물들을 동시에 처리하는 것을 특징으로 하는, 자외선 조사로 유도되는 피부세포의 사멸을 방지하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 단독 처리시에는 효과가 없는 낮은 농도의 두 화합물을 혼합하여 처리함으로써 자외선 조사에 의해 유발되는

출원번호: 10-2004-0020800

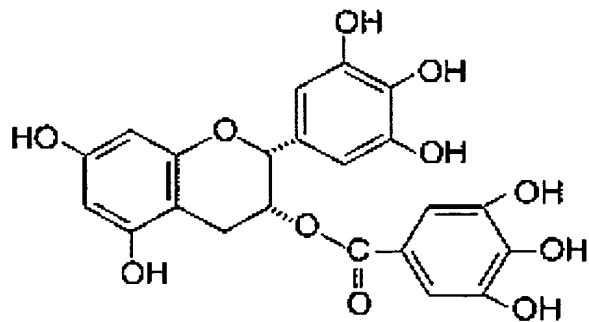
Bcl-2의 발현 감소를 효과적으로 억제하여 피부세포의 사멸을 방지하는 Bcl-2 발현 조절제로서의 용도를 제공한다. 또한, 암억제 유전자인 Rb 단백질의 탈인산화를 억제하여 안정화시킴으로써 자외선에 의한 피부세포의 손상을 방지하는 용도를 제공한다.

【화학식 1】



<7>

【화학식 2】



<8>

<9> A. 인체에서의 Bcl-2의 기능과 발현 조절

<10> 피부 노화의 가장 중요한 요인으로 280-320nm 파장의 자외선 B(UVB)를 들 수 있다. 피부가 자외선에 노출되면 DNA, 단백질 등의 세포 성분이 손상되어 일광화상(sunburn) 세포가 생성되며, 이들은 카스페이즈(caspase) 효소의 활성화 및 효소의 작용에 따른 DNA 단편화 현상을 동반하는 세포사멸 과정을 겪으면서 죽음에 이른다. 이처럼, 세포사멸 현상은 손상된 세포들의 죽음을 유도하여 이들이 종양으로 발전하는 것을 막는다.

<11> bcl-2는 이러한 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 수행하는 유전자로서, 핵막과 미토콘드리아 외막에 존재하는 26kDa의 단백질을 암호한다. 발현 단백질인 Bcl-2는 Bax와 같은 세포사멸을 촉진하는 단백질에 붙어서 이들의 기능을 방해함으로써 세포사멸을 억제하는 단백질이다. Bcl-2 단백질과 Bax 단백질 사이의 농도비에 따라 세포가 사멸될 것인지 아닌지가 결정된다. 현재까지 Bcl-2는 피부세포에서 자외선 조사에 의해 그 발현이 급격히 감소된다고 보고되었다. 또한, Bcl-2를 과발현시킨 세포는 자외선 조사에 의한 세포사멸이 억제된다는 것도 보고되었다. 하지만, Bcl-2의 과발현은 오히려 심각한 DNA 손상을 가진 세포의 사멸까지 저해하여 암을 유발할 수도 있다. 그러므로 Bcl-2의 발현을 특이적으로 조절하는 것이 매우 중요하다. 이에, 본 연구진은 Bcl-2의 발현 조절제에 대하여 예의 연구해 왔으며, 그 결과로서 인삼의 정제 사포닌에서 분리한 20-O- β -D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올(진세노사이드 F1)을 유효한 농도(5mM)로 인간 피부세포주인 HaCaT 세포에 처리했을 때 자외선 조사에 의해 감소되었던 Bcl-2의 발현이 정상적인 농도

출원번호: 10-2004-0020800

로 유지된다는 것과 이를 통해 세포사멸이 억제된다는 것을 확인한 바 있다.

<12> B. (-) 에피갈로카테킨-3-갈레이트 (EGCG)

<13> 녹차의 폴리페놀성분인 EGCG는 강력한 항산화 기능과 유해한 라디칼을 효과적으로 제거하는 기능을 가지고 있다. 또한 본 화합물은 자외선에 의한 염증반응과 피부암 유발을 방지한다고 알려져 있다. 최근에는 EGCG가 인체의 정상 각질 형성세포에서 Bcl-2의 발현은 증가시키고 Bax의 발현은 감소시켜 자외선에 의한 세포사멸을 방지한다는 보고가 있다. 그러나, 편평상피암세포에 EGCG를 처리하면 오히려 Bax 단백질의 인산화를 감소시켜 암세포의 증식을 억제하는 효과를 보였다. 하지만, 아직까지 세포사멸과 세포증식에 관련된 신호전달과정 중 EGCG의 타겟은 알려져 있지 않다.

<14> C. 레티노블라스토마(Rb : Retinoblastoma) 단백질

<15> 암 억제유전자(tumor suppressor)에 의해 발현되는 Rb 단백질은 발생, 암, 세포 성장과 분화, 사멸에 중요한 역할을 한다. 이 단백질은 핵 단백질로서 세포주기나 DNA 손상을 가져오는 요인에 의해 인산화가 조절되어 E2F 전사인자와 함께 세포사멸에 관여한다. 또한, Bcl-2의 과발현이 Rb 단백질의 탈인산화를 억제하여 안정화시킴으로써 세포사멸을 억제하는데도 관여한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 이러한 연구 결과를 토대로, 본 발명자들은 상기한 두 화합물의 상승효과에 의한 용도를 제공하고자 계속적으로 연구하여 왔으며, 단독 처리시에는 효과가 없

출원번호: 10-2004-0020800

는 낮은 농도의 두 화합물을 혼합하여 동시에 처리함으로써 자외선 조사에 의해 유발되는 Bcl-2의 발현 감소를 효과적으로 억제할 수 있고, 이를 통해 세포사멸을 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<17> 따라서, 본 발명의 목적은 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사로 유도되는 세포사멸을 방지하는 방법을 제공하는 것이다.

<18> 또, 본 발명의 다른 목적은 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사로 유발되는 Bcl-2 발현 감소를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

<19> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사로 유발되는 Brn-3a 발현 감소를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

<20> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사로 유발되는 암억제 단백질인 Rb의 탈인산화를 방지하여 안정화시키는 방법을 제공하는 것이다.

<21> 또한, 본 발명의 또다른 목적은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유함으로써, 자외선에 의한 피부손상을 막고 노화를 억제할 수 있는 피부용제 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<22> 상기한 본 발명의 목적들은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 형태로 구현될 수 있다. 본 발명에 의한 조성물은 피부 세포사멸 등에 관여하여 피부 노화 방지, 피부세포 활성 유지 등의 작용을 한다.

<23> 바람직하게는, 상기 진세노사이드 F1과 EGCG의 혼합물 조성물 총 중량에 대

출원번호: 10-2004-0020800

하여 0.0001~10 중량%의 양으로 함유될 수 있다. 또한, 상기 진세노사이드 F1과 EGCG의 비율은 중량비로 1:0.1~10의 비율로 함유되는 것이 바람직하다.

<24> 보다 구체적으로, 본 발명은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 저선량의 자외선에 의해 유도되는 세포사멸 억제제를 제공한다.

<25> 또, 본 발명은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 자외선에 의해 감소되는 Bcl-2 발현 조절제를 제공한다.

<26> 또한, 본 발명은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 자외선에 의해 감소되는 Brn-3a 발현 조절제를 제공한다.

<27> 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

<28> 본 연구진에 의해, 진세노사이드 F1 자체는 Bcl-2의 발현을 증가시키지는 않지만 자외선에 의해 Bcl-2의 발현이 감소되는 것을 억제하는 것으로 확인되었다. 즉, 진세노사이드 F1은 Bcl-2의 전사조절인자인 Brn-3a의 발현을 조절함으로써 Bcl-2의 발현 농도를 정상세포 수준으로 유지하는 것이며, 이로 인해 저선량의 자외선에 의해 피부세포가 사멸되는 것을 방지할 수 있는 것이다. 한편, 고선량의 자외선 조사에 대해서는 Bcl-2 발현이 감소되어 세포사멸 과정이 그대로 진행되기 때문에, 피부암으로 발전하는 위험성을 제거할 수 있다.

<29> 또한, 본 연구진은 진세노사이드 F1이 상기한 효과에 있어서 EGCG와 상승 작용을 한다는 것을 후술하는 실시예를 통해 확인하였다. 보다 구체적으로, 단독 처

출원번호: 10-2004-0020800

리시에는 효과가 없는 낮은 농도의 두 화합물을 혼합하여 인간 피부세포주인 HaCaT 세포에 처리했을 때, 자외선 조사에 의해 감소되었던 Bcl-2의 발현이 정상적인 농도로 유지되며, 이를 통해 세포사멸이 억제된다는 것을 확인하였다. 또한, 이전의 연구 결과를 토대로 EGCG와의 상승 작용에 있어서도, 세포사멸 억제 효과가 Bcl-2에 특이적인 전사조절인자인 Brn-3a의 발현을 조절함으로써 일어난다는 것을 다시 한번 확인하였다. 더구나, 두 화합물을 동시에 처리했을 때에만, 암억제 단백질인 Rb의 탈인산화를 막아서 세포사멸을 억제하는 효과를 보였다. 위의 결과로부터 진세노사이드 F1과 EGCG는 낮은 농도로 사용하여도 서로 상승작용을 통하여 세포내에 항상 일정량의 Bcl-2의 농도가 유지될 수 있도록 하며, Rb 단백질의 탈인산화를 막아서 세포가 사멸되는 것을 방지하는 효능을 가진다는 것을 알 수 있다.

<30> 따라서, 진세노사이드 F1과 EGCG는 서로 상승 작용을 통하여 세포내에 항상 일정량의 Bcl-2의 농도가 유지될 수 있도록 하여 세포가 사멸되는 것을 방지할 수 있다. 또한, 진세노사이드 F1 자체는 Bcl-2의 발현을 증가시키지 않으므로 암 발생의 부작용 없이, 자외선에 의한 세포사멸을 억제, 세포손상을 방지하여 피부노화를 억제할 수 있는 물질로서의 활용 가능한 용도를 제공한다.

<31> 이에, 본 발명은 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효성분으로 함유하는 피부외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 자외선에 의한 피부손상 및 이로 인한 피부노화를 억제하는 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 조성물은 화장품으로 제형화될 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다.

<32> 본 발명에서 이용되는 진세노사이드 F1은 인삼으로부터 제조된 정제 사포닌

출원번호: 10-2004-0020800

을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 얻은 화합물이다. 그러나, 진세노사이드 F1을 획득하는 방법에 있어서 위의 방법에 한정되는 것은 아니다.

<33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리 범위가 이들 실시예에 한정되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

<34> <참조예 1> 인삼 정제 사포닌의 제조 :

<35> 홍삼(담배인삼공사, 6년산 홍삼) 2kg에 물을 포함한 메탄올 4ℓ를 넣고, 3회 환류 추출한 후, 15℃에서 6일간 침적시켰다. 그 후, 여과포 여과와 원심분리를 통해 잔사와 여액을 분리하고, 분리된 여액을 감압농축하였다. 농축액을 물에 현탁한 후에, 에테르 1ℓ로 5회 추출하여 색소를 제거하였다. 수층을 1-부탄올 500ml로 3회 추출하여 얻은 1-부탄올층 전체를 5% KOH로 처리한 후 증류수로 세척하였다. 이어서, 감압농축하여 1-부탄올 추출액을 얻고, 이를 소량의 메탄올에 녹인 다음, 대량의 에틸아세테이트에 추가하였다. 얻은 침전물을 건조하여 인삼 정제 사포닌 70g

출원번호: 10-2004-0020800

을 얻었다.

<36> <참조예 2> 진세노사이드 F1의 제조 :

<37> 참고예 1의 인삼 정제 사포닌 10g을 시트레이트 완충용액(pH4.0) 1000ml에
용해시키고, 여기에 페니실리움속에서 분리한 나린지나제(Sigma, St. Louis, MO)
15g을 첨가하여 40℃의 수욕상에서 48시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 반응이
종료된 후 10분간 가열하여 효소를 실효시키고, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로
3회 추출하여 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (클로로포
름:메탄올=9:1)로 분리하여 진세노사이드 F1 1.5g을 얻었다.

<38> <실시예 1> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 HaCaT 세포의 사멸 억
제 효과 :

<39> [단계 1] 세포주와 세포 배양

<40> 인체 피부 세포주(human keratinocyte)인 HaCaT(Dr. N.E. Fusenig(Deutsches
Krebsforschungszentrum(DKFZ), Heidelberg, Germany)로부터 구하였다)을 10% 우혈
청을 포함한 DMEM 배지(Dulbecco' s modified Eagle' s medium, Gibco 1210-
0038)에서 배양하였고, 배양은 모두 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다.

<41> [단계 2] 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사시 유도되
는 HaCaT 세포의 사멸 억제

출원번호: 10-2004-0020800

<42>

단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

<43>

자외선 조사 24시간 후, 각 화합물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT, Sigma) 용액을 넣고 37°C 에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO를 넣고 녹인 후 ELISA reader(Thermo Max, Molecular Devices Co.)를 이용하여 540nm의 파장에서 형성된 포르마잔 다이의 광학적 농도(OD)를 측정하였다. 자외선을 조사하지 않은 세포의 OD값을 100%로 계산하여 상대적인 값을 세포의 생존수로 나타내었으며, 그 결과로도 1에 나타내었다.

<44>

도 1에서 보는 바와 같이, 2mM의 진세노사이드 F1 또는 10mM의 EGCG를 단독

출원번호: 10-2004-0020800

으로 처리했을 때에는, 처리하지 않은 대조구와 비교하여, 자외선에 의해 사멸되는 세포수가 차이가 없었다. 그러나, 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의EGCG를 혼합하여 처리한 세포의 경우, 처리하지 않은 세포에 비교하여, 자외선에 노출되었을 때 약 2배 정도 세포 사멸이 억제되었다. 이것은 5mM의 진세노사이드 F1 단독 또는 50mM의 EGCG 단독을 각각 처리한 경우와 같은 정도의 세포 사멸 억제 효과를 보였다.

<45> <실시예 2> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 PARP 단백질의 절단 억제 효과 :

<46> [단계 1] 세포주와 세포 배양

<47> 실험에 이용된 세포주와 세포 배양은 실시예 1의 단계 1에서와 동일하였다.

<48> [단계 2] 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사시 유발되는 PARP 단백질의 절단 억제

<49> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO

출원번호: 10-2004-0020800

에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 $60\text{mJ}/\text{cm}^2$ 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

<50>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아(thiourea), 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴(leupeptine)이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-PARP(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. PARP 단백질의 절단된 양은 대조구의 절단된 양을 기준으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

출원번호: 10-2004-0020800

<51> 도 2에서 보는 바와 같이, 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의EGCG를 혼합하여 처리한 세포의 경우, 처리하지 않은 세포 또는 같은 농도의 각 화합물을 단독으로 처리했을 때와 비교하여, 자외선 조사에 의해 일어나는 PARP 단백질의 절단화 현상이 1.4배 정도 감소하였다.

<52> <실시예 3> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Bcl-2의 발현 감소 억제 효과 :

<53> [단계 1] 세포주와 세포 배양

<54> 실험에 이용된 세포주와 세포 배양은 실시예 1의 단계 1에서와 동일하였다.

<55> [단계 2] 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사시 유발되는 Bcl-2의 발현 감소 억제

<56> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였

출원번호: 10-2004-0020800

다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

<57>

자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50 V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Bcl-2(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<58>

도 3에서 보는 바와 같이, 자외선을 조사했을 때, 약물을 처리하지 않은 세포의 경우, Bcl-2 단백질은 거의 발현되지 않았다. 2mM의 진세노사이드 F1 또는 10mM의 EGCG를 단독으로 처리했을 때에도 약물을 처리하지 않은 대조구와 비교하

출원번호: 10-2004-0020800

여 Bcl-2 발현에 큰 차이가 없었다. 그러나, 두 화합물을 동시에 처리한 세포의 경우 자외선을 조사했을 때도 조사하지 않은 경우와 비교하여 거의 차이가 없을 정도로 발현이 유지되었다. 즉, 두 화합물을 동시에 처리하면, 처리하지 않은 경우나 또는 각 화합물을 단독으로 처리했을 때와 비교하여 Bcl-2 단백질의 발현이 3배 정도 증가하였다.

<59> <실시에 4> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Brn-3a의 발현 감소

억제 효과 :

<60> [단계 1] 세포주와 세포 배양

<61> 실험에 이용된 세포주와 세포 배양은 실시예 1의 단계 1에서와 동일하였다.

<62> [단계 2] 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사시 유발되는 Brn-3a의 발현 감소 억제

<63> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을

출원번호: 10-2004-0020800

처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 $60\text{mJ}/\text{cm}^2$ 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

<64> 자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질을 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Brn-3a(Santa Cruz)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<65> 도 4에서 보는 바와 같이, Brn-3a 단백질은 자외선 조사에 의해 그 발현이 감소되었다가, 두 화합물을 동시에 처리했을 때만 다시 발현이 회복되었다.

<66> <실시에 5> 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한 Rb 단백질의 탈인산화

억제 효과 :

<67> [단계 1] 세포주와 세포 배양

<68> 실험에 이용된 세포주와 세포 배양은 실시예 1의 단계 1에서와 동일하였다.

<69> [단계 2] 진세노사이드 F1과 EGCG 동시 처리에 의한, 자외선 조사시 유발되는 Rb 단백질의 탈인산화 억제

<70> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신으로 처리하여 단일세포 현탁액을 만든 후, 6-well에 2×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그런 다음, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 2mM의 진세노사이드 F1; 10mM의 EGCG; 2mM의 진세노사이드 F1과 10mM의 EGCG를 혼합한 것; 5mM의 진세노사이드 F1; 및 50mM의 EGCG를 각각 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였고, EGCG(Sigma)는 DMSO에 녹여서 배지의 1/1000의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 각 화합물들을 처리한 후, PBS로 세척하고, PBS를 넣은 상태에서 60 mJ/cm^2 농도의 UVB를 조사하였다. 그런 다음 PBS를 버리고, 다시 같은 농도의 각 화합물이 포함된 배지로 교환하였다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다.

<71> 자외선 조사 24시간 후, 약물들을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 PBS로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하였다. 여기에, 8M 우레아, 2%

출원번호: 10-2004-0020800

CHAPS, 50mM DTT, 2M 티오우레아, 2mM PMSF 및 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류펩틴이 함유된 단백질 추출 완충용액 $500\mu\text{l}$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그런 다음, 4°C 에서 10분간 $15,000 \times g$ 의 중력가속도로 원심분리하여 상층액을 수거한 후, BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 $20\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad) 막에 블로팅하였다. 이 블롯을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 polyclonal anti-Rb(Santa Cruz; 모든 형태의 Rb(과인산화, 저인산화 형태 등) 감지)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 같은 블롯을 6.25 mM Tris, 2% SDS, 100mMβ-머캅토에탄올의 용액으로 50°C 에서 10분씩 2번 세척하였다. 다시 5% 무지방 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹한 후, 1차 항체로 monoclonal anti-underphosphorylated Rb(BD Biosciences; 저인산화 형태의 Rb만 감지)를, 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham)를 이용하고, Amersham사의 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트를 이용하여 항체 반응시켰다. 반응시킨 블롯은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(UMAX)를 이용하여 스캐닝한 후, ImageMaster 2D Elite(Amersham Biosciences) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

출원번호: 10-2004-0020800

<72>

도 5에서 보는 바와 같이, Rb 단백질은, 약물 단독 처리시나 처리하지 않았을 때에는 자외선 조사에 의해 탈인산화가 일어나서 저인산화 형태가 나타났지만, 두 화합물을 혼합하여 동시에 처리했을 때에는 이러한 Rb 단백질의 탈인산화가 억제되어 모든 형태의 Rb 단백질이 존재하게 되었다.

<73>

이하, 본 발명에 따른 진세노사이드 F1 및 EGCG를 함유하는 외용제 조성물을 제형예를 들어 설명하지만, 본 발명의 외용제 조성물의 제형이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

【표 1】

<74>

제형예 1 : 유연화장수

성 분	함량(중량%)
베타인	4.0
넛토검	0.1
셀룰로오스검	5.0
에탄올	5.0
부틸렌글리콜	5.0
폴리옥시에틸렌 경화피마자유	0.2
초산토코페롤	5.0
방부제	미량
색소	미량
EGCG	0.0005
진세노사이드 F1	0.0001
정제수	to 100

출원번호: 10-2004-0020800

【표 2】

<75> 제형예 2 : 영양화장수

성 분	함량(중량%)
세틸에틸헥사노에이트	5.0
세토스테아릴알콜	1.5
친유형모노스테아린산 스테아레이트	1.2
스쿠알란	2.0
폴리솔베이트 60	1.2
솔비탄세스퀴올레이트	0.8
글리세린	8.0
트리에탄올아민	0.2
카르복시비닐폴리머	0.2
EGCG	0.001
진세노사이드 F1	0.001
방부제	미량
색소	미량
향	미량
정제수	to 100

【표 3】

<76> 제형예 3 : 영양크림

성 분	함량(중량%)
밀납	1.0
글리세틸스테아레이트	2.0
세토스테아레이트	2.5
폴리솔베이트 60	1.2
솔비탄세스퀴올레이트	0.4
세틸에틸헥사노에이트	5.0
스쿠알란	7.0
유동파라핀	8.0
글리세린	8.0
프로필렌글리콜	5.0
식물추출물	5.0
EGCG	0.05
진세노사이드 F1	0.01
방부제	미량
색소	미량

출원번호: 10-2004-0020800

항	미량
정제수	to 100

【표 4】

<77> 제형예 4 : 에센스

성 분	함량(중량%)
글리세린	15.0
프로필렌글리콜	5.0
셀룰로오스겔	0.1
나트도검	5.0
히아루론산추출물	8.0
아미노프로판술폰산	2.0
카르복시비닐폴리머	0.3
에탄올	5.0
폴리옥시에틸렌 경화피마자유	0.5
트리에탄올아민	0.3
EGCG	0.1
진세노사이드 F1	0.01
방부제	미량
향	미량
색소	미량
정제수	to 100

【표 5】

<78> 제형예 5 : 로션

성 분	함량(중량%)
글리세릴스테아레이트	1.5
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
세틸에틸헥사노에이트	2.0
스쿠알란	3.0
글리세린	8.0
카르복시비닐폴리머	0.5

출원번호: 10-2004-0020800

가수분해폴라젠	1.0
트리에탄올아민	0.5
EGCG	1.0
진세노사이드 F1	0.5
방부제	미량
향료	미량
색소	미량
정제수	to 100

【표 6】

<79> 제형예 6 : 연고

성 분	함량(중량%)
카프린/카프릴 트리글리세리드	10.0
액상 파라핀	10.0
솔비탄세스퀴올레이트	6.0
옥틸도데세스-25	10.0
세틸에틸헥사노에이트	10.0
스쿠알란	1.0
살리실산	1.0
프로필렌글리콜	15.0
솔비톨	1.0
EGCG	0.01
진세노사이드 F1	0.01
정제수	to 100

【표 7】

<80> 제형예 7 : 분무제

성 분	함량(중량%)
트리에탄올아민	0.2
폴리비닐피롤리돈/비닐아세테이트	3.0
프로필렌글리콜	8.0
폴리아크릴레이트	0.2
EGCG	0.0005

출원번호: 10-2004-0020800

진세노사이드 F1	0.0001
정제수	to 100

【발명의 효과】

<81>

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에서 진세노사이드 F1과 EGCG을 단독으로 처리했을 때에는 효과가 없는 낮은 농도의 두 화합물을 동시에 처리하게 되면, 상승작용을 통해 자외선 조사시 유발되는 Bcl-2의 발현 감소 및 그의 전사인자인 Brn-3a의 발현 감소를 억제함으로써, 또한 Rb 단백질의 탈인산화를 저해함으로써 자외선에 의한 세포사멸을 방지할 수 있다. 따라서, 본 발명은 낮은 농도의 진세노사이드 F1과 EGCG를 동시에 처리하여 자외선 노출에 의한 세포손상을 방지하여 피부 노화를 억제할 수 있는 물질로서 활용 가능한 용도를 제공한다. 또한 본 발명을 통해 단가가 높은 두 화합물을 낮은 농도(단독 사용시 각각 2.5배, 5배 농도 필요)로 사용함으로써 원료비를 낮추어 고기능성 제품을 보다 저렴한 가격에 공급할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

저선량의 자외선 조사로 유도되는 세포사멸 억제제에 있어서, 20-O-b-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올(진세노사이드 F1)과 (-)에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 세포사멸 억제제.

【청구항 2】

자외선 조사로 감소되는 Bcl-2 발현 조절제에 있어서, 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Bcl-2 발현 조절제.

【청구항 3】

자외선 조사로 감소되는 Brn-3a 발현 조절제에 있어서, 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Brn-3a 발현 조절제.

【청구항 4】

진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Rb 단백질의 탈인산화 억제제.

【청구항 5】

저농도의 진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하여 자외선 노출에 의한 세포손상을 방지하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 억제제.

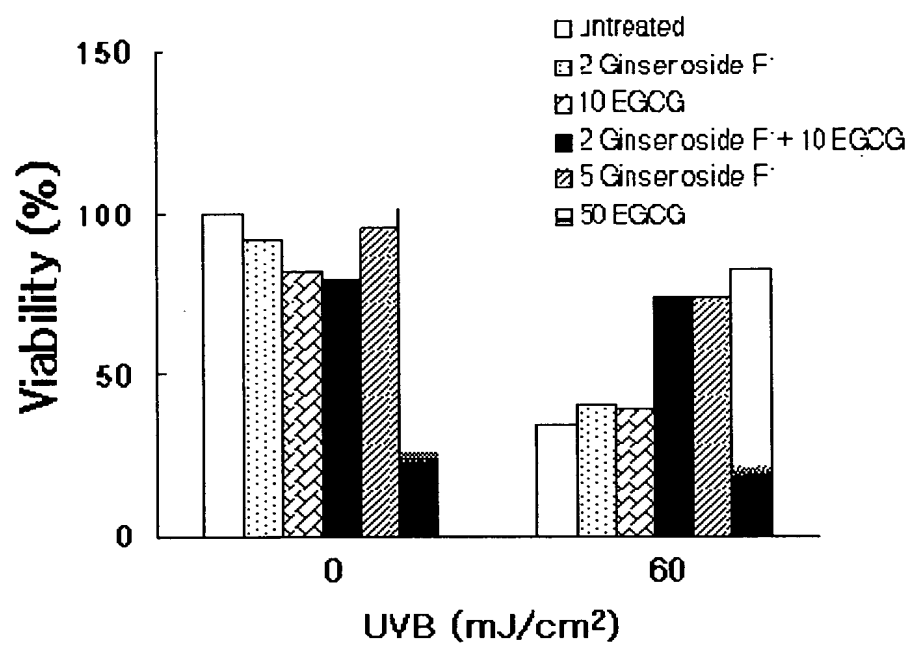
출원번호: 10-2004-0020800

【청구항 6】

진세노사이드 F1과 EGCG 혼합물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부외용제 조성물.

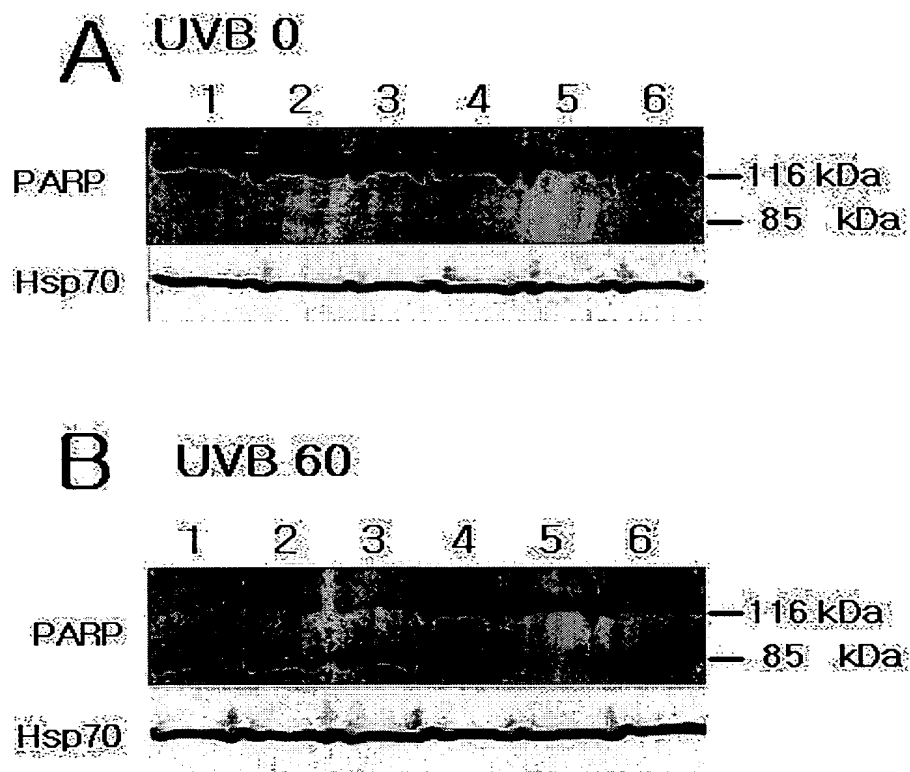
【도면】

【도 1】



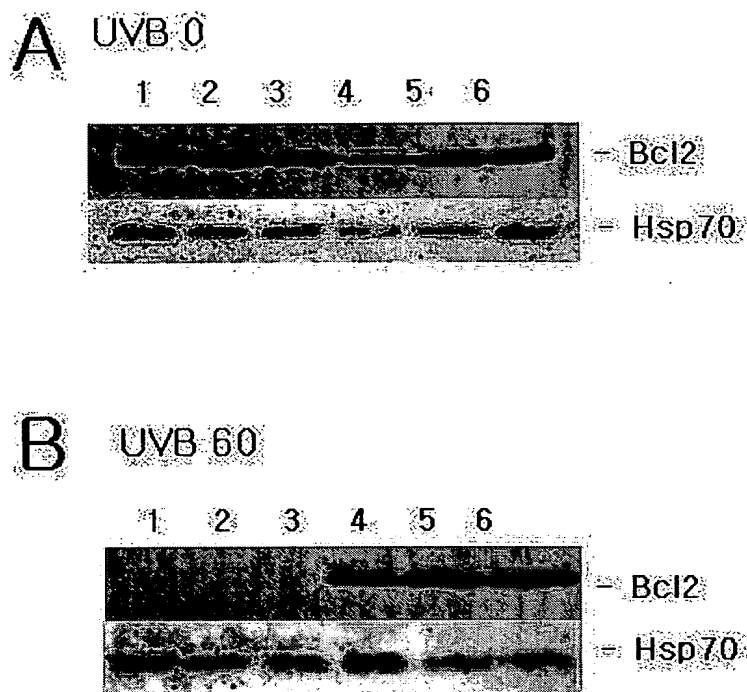
출원번호: 10-2004-0020800

【도 2】

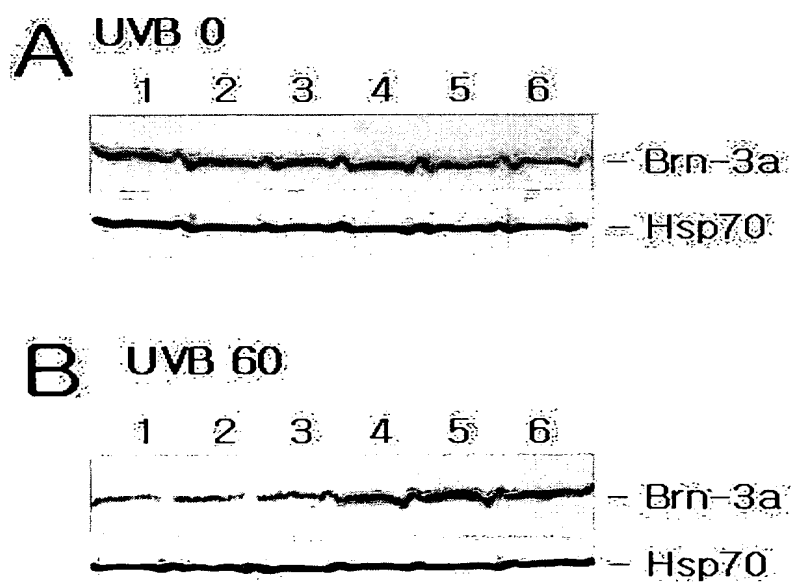


출원 번호: 10-2004-0020800

【도 3】



【도 4】



출원번호: 10-2004-0020800

【도 5】

